

日本国特許庁  
JAPAN PATENT OFFICE

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出願年月日 2003年 5月12日  
Date of Application:

出願番号 特願2003-132464  
Application Number:  
[ST. 10/C]: [JP 2003-132464]

出願人 株式会社日立製作所  
Applicant(s):

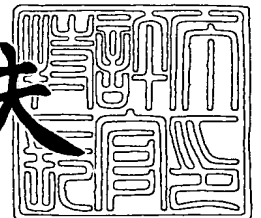
U.S. Appln. Filed 3-2-04  
Inventor: Y. Kohara et al  
mattingly, Stanger & malor  
Docket H&A-126

特許庁  
JAPAN

2004年 2月23日

特許庁長官  
Commissioner,  
Japan Patent Office

今井康夫



出証番号 出証特2004-3012246

【書類名】 特許願

【整理番号】 H03005121A

【あて先】 特許庁長官 殿

【国際特許分類】 C12Q 1/68

【発明者】

【住所又は居所】 東京都国分寺市東恋ヶ窪一丁目 2 8 0 番地 株式会社日立製作所中央研究所内

【氏名】 小原 賢信

【発明者】

【住所又は居所】 東京都国分寺市東恋ヶ窪一丁目 2 8 0 番地 株式会社日立製作所中央研究所内

【氏名】 岡野 和宣

【発明者】

【住所又は居所】 東京都国分寺市東恋ヶ窪一丁目 2 8 0 番地 株式会社日立製作所中央研究所内

【氏名】 野田 英之

【特許出願人】

【識別番号】 000005108

【氏名又は名称】 株式会社 日立製作所

【代理人】

【識別番号】 100075096

【弁理士】

【氏名又は名称】 作田 康夫

【電話番号】 03-3212-1111

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 013088

【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 図面 1

【物件名】 要約書 1

【プルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 微粒子アレー分析システム、微粒子アレーキットおよび化学分析方法

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

磁性を有する微粒子及び／又は非磁性微粒子を収める容器と  
前記容器に試料及び溶液を導入する導入手段と、  
前記容器の外側に設置され、前記磁性を有する微粒子の前記容器に対する相対的な位置を磁氣的に制御する位置制御手段とを有し、  
前記磁性を有する微粒子及び／又は前記非磁性微粒子は前記容器内で任意の配列で収納されていることを特徴とする微粒子アレー分析システム。

【請求項 2】

前記非磁性微粒子は、表面にプローブを固定され、かつ前記磁性を有する微粒子に挟まれて前記容器内に収納されていることを特徴とする請求項 1 に記載の微粒子アレー分析システム。

【請求項 3】

前記磁性を有する微粒子は、複数用いられるものであり、少なくとも 1 つ以上の前記磁性を有する微粒子は表面にプローブが固定されていることを特徴とする請求項 1 に記載の微粒子アレー分析システム。

【請求項 4】

前記プローブと前記試料に含まれる生体関連分子との結合を検出する検出部と、  
前記検出の結果を解析する解析部とをさらに有することを特徴とする請求項 2 に記載の微粒子アレー分析システム。

【請求項 5】

前記位置制御手段は、前記容器の外側に可動的に設けられる磁石部材であり、前記磁石部材は、前記容器に対して相対的に動くものであることを特徴とする請求項 1 に記載の微粒子アレー分析システム。

【請求項 6】

前記位置制御手段は、前記容器の外側に設けられる電磁石であり、前記電磁石は生じさせる磁場の変化に応じて、前記磁性を有する微粒子の前記電磁石への補足および前記電磁石からの解離を制御するものであることを特徴とする請求項 1 に記載の微粒子アレー分析システム。

【請求項 7】

前記容器は内部に分岐する流路を有し、

前記磁性を有する微粒子及び／又は前記非磁性微粒子は、一の流路に収納され、任意の前記磁性を有する微粒子及び／又は前記非磁性微粒子は、他の流路の開口端よりを取り出されることを特徴とする請求項 1 に記載の微粒子アレーシステム。

【請求項 8】

前記容器の開口端より取り出された前記磁性を有する微粒子及び／又は前記非磁性微粒子により収集する、試料中の特定分子を移送する移送機構と、

前記移送機構につながる電気泳動装置とをさらに有することを特徴とする請求項 1 に記載の微粒子アレー分析システム。

【請求項 9】

前記容器の開口端より取り出された前記磁性を有する微粒子及び／又は前記非磁性微粒子により収集する、試料中の特定分子を移送する移送機構と、

前記移送機構につながる質量分析装置とをさらに有することを特徴とする請求項 1 に記載の微粒子アレー分析システム。

【請求項 1 0】

磁性を有する微粒子及び／又は非磁性微粒子を収納する容器と、

前記容器の外側に配置される磁石部材と、

特定分子と結合するものであり、かつ前記容器の内部のいずれかの位置に固定されるプローブとを有し、

前記磁性を有する微粒子及び／又は前記非磁性微粒子は前記容器内で任意の配列で収納されていることを特徴とする微粒子アレーキット。

【請求項 1 1】

前記プローブは前記非磁性微粒子に固定されることを特徴とする請求項 1 0 に

記載の微粒子アレーキット。

【請求項 12】

前記プローブは前記磁性を有する微粒子に固定されることを特徴とする請求項 10 に記載の微粒子アレーキット。

【請求項 13】

前記容器は、キャピラリーもしくは基板に設けられた溝であることを特徴とする請求項 10 に記載の微粒子アレーキット。

【請求項 14】

特定分子と特異的に結合するプローブと、任意の配列で並ぶ磁性を有する微粒子及び／又は非磁性微粒子とが収められた容器を設置する工程と、

前記特定分子を含む試料と溶液とを前記容器に導入する工程と、

前記容器の外部に設置する磁石部材を用いて前記磁性を有する微粒子の位置を制御する工程と、

前記特定分子と前記プローブとの結合の結果を検出する工程を有することを特徴とする化学分析方法。

【請求項 15】

前記プローブは前記磁性を有する微粒子に結合していることを特徴とする請求項 14 に記載の化学分析方法。

【請求項 16】

前記プローブは前記非磁性微粒子に結合しており、

前記容器に収める工程では、前記非磁性微粒子は前記磁性を有する微粒子に挟まれて前記容器内に収納されていることを特徴とする請求項 14 に記載の化学分析方法。

【請求項 17】

前記磁性を有する微粒子及び／又は前記非磁性微粒子を回収する工程をさらに有し、

前記磁性を有する微粒子の位置を制御する工程では、前記磁石部材を前記容器に対して相対的に動かすことにより、前記磁性を有する微粒子を前記容器に対して相対的に動かし、

前記回収する工程では、前記磁性を有する微粒子または前記非磁性微粒子は、前記磁性を有する微粒子の動きにより、前記容器の開口端より取りだされ、回収されることを特徴とする請求項 16 に記載の化学分析方法。

#### 【請求項 18】

前記磁性を有する微粒子及び／又は前記非磁性微粒子を回収する工程をさらに有し、

前記磁性を有する微粒子の位置を制御する工程では、前記磁石部材として電磁石を用い、前記電磁石の磁場を制御することにより、前記電磁石による任意の前記磁性を有する微粒子の補足および解離を制御し、

前記回収する工程では、任意の前記磁性を有する微粒子は、前記電磁石による補足の後に解離されて、前記容器の内部に生じる前記溶液の流れで輸送され、かつ前記容器の開口端より取り出され、回収されることを特徴とする請求項 15 に記載の化学分析方法。

#### 【発明の詳細な説明】

##### 【0001】

##### 【発明の属する技術分野】

本発明は生体関連分子の分析に関わり、特にDNA、RNA等の核酸やタンパク質の分析に関する。また、本発明は生体関連分子を分析する微粒子アレーの分野に属する。

##### 【0002】

##### 【従来の技術】

生体物質を分析するマイクロアレーは、特にDNAの多項目解析に対して頻繁に用いられている。マイクロアレーは通常、固体表面上に数多くのプローブを種類毎に区分けして固定し、作成される。このプローブアレーとしては、区画された多数のセルに、光化学反応と半導体製造工程で広く使用されるリソグラフィーを用いて、設計された配列のオリゴマーを1塩基ずつ合成していく方法（例えば、非特許文献1）で作製されたものや、プローブ溶液を各区画にスポットする方法（例えば、非特許文献2）で作製されたものがある。いずれの方法においてもDNAマイクロアレーの作製には手間と時間がかかり、制作費が高くなる難点があっ

た。その難点を解消するために微粒子を用いたプローブアレー、すなわち微粒子アレーが開発された。光ファイバー束の端にプローブ固定化ビーズを固定した微粒子アレー（例えば、非特許文献 3）やキャピラリーの中にプローブ固定化ビーズを特定の順序で並べるプローブアレー（ビーズアレー）（例えば、特許文献 1）が報告されている。また、ビーズを固定しない微粒子アレーとして、複数種のカラーコードビーズを同時に使用し、フローサイトメータで計測する方法（例えば、非特許文献 4）が報告されている。

#### 【 0 0 0 3 】

一方、溶液中にある生体関連分子を回収する技術として、微粒子を使用する方法が良く使われる。たとえば、溶液中の核酸を回収する際にはシリカビーズを溶液中に混合し、核酸を表面に吸着させた後に遠心し、シリカビーズごと回収することが行われる。また微粒子の回収を容易にするために、磁気微粒子を用い、磁石を近づけることで溶液から磁気微粒子を分離し回収するという方法がある。例えば、核酸の抽出にこの過程を応用した自動化装置が作製されている（例えば、非特許文献 5）。

#### 【 0 0 0 4 】

【非特許文献 1】 Science, 251, 767-773 (1991)

【非特許文献 2】 Science, 270, 467-470 (1995)

【非特許文献 3】 Science, 287, 451-452 (2000)

【非特許文献 4】 Clinical Chemistry, 43, 1749-1756 (1997)

【非特許文献 5】 Journal of Bioscience and Bioengineering, 91, 500-503 (2001)

【特許文献 1】 特開平 11-243997 号公報

#### 【発明が解決しようとする課題】

従来のマイクロアレーでは、マイクロアレー上に捕捉された生体関連分子をプローブ種別に取り出して、さらに詳しく解析する手段が存在しない。一つのプローブに捕捉される生体関連分子は必ずしも一つではなく、複数種あることが予測されるため、その内訳を知ることは非常に重要である。また従来の微粒子アレーでは、配列させた後に任意のビーズの位置を制御することが難しい。また従来の



微粒子を用いた生体関連分子の回収方法はバッチ操作であるため一種類のビーズを使うことしかできない。回収対象の異なる複数種類のビーズを用いたとしても、ビーズの種類ごとにビーズを識別、回収することは困難であるため、多項目解析および回収を行うことはできない。

#### 【0005】

##### 【課題を解決するための手段】

以上を踏まえて、多項目解析に対応するプローブ種別に捕捉された生体関連分子を回収し、かつ解析する手段を提供することを目標とする。

上記目標を達成する手段として、磁気微粒子を配列した微粒子アレーと磁気微粒子を操作するための磁石を組み合わせた微粒子アレー分析システム、微粒子アレーキット、また化学分析方法を提供する。この微粒子アレーはプローブが固定された微粒子をキャピラリーもしくはチップに形成した流路に並べたものであり、その並び順は微粒子に固定されたプローブの種類を識別するべく、予め定められているものとする。この微粒子アレー中の微粒子にはプローブが固定されていないものも含まれていてもよい。また微粒子の一部にはかならず、磁気微粒子を使用するものとする。

#### 【0006】

また、磁石を利用してプローブが固定された微粒子を容器内から流れ出ないように固定し、サンプルを磁気微粒子アレーに供給し、サンプルに含まれる生体関連分子を微粒子上に捕捉し、(3) 磁石を操作して目的のプローブに対応する微粒子を移動させ、(4) 移動させた微粒子を回収する。

#### 【0007】

本発明に係わる微粒子アレー分析システムは、磁性を有する微粒子及び／又は非磁性微粒子を収める容器と、容器に試料及び溶液を導入する導入手段と、容器の外側に設置され、磁性を有する微粒子の容器に対する相対的な位置を磁氣的に制御する位置制御手段とを有し、磁性を有する微粒子及び／又は非磁性微粒子は容器内で任意の配列で収納されていることを特徴とする。非磁性微粒子とは、実質的に磁性を有しない微粒子であって、例えばガラスなどを材料とする。微粒子アレー分析システムは、プローブと試料に含まれる生体関連分子との結合を検出

する検出部と、検出の結果を解析する解析部とをさらに有してもよい。

#### 【0008】

位置制御手段については、容器の外側に可動的に設けられる磁石部材でもよく、磁石部材は、容器に対して相対的に動くものでもよい。また、容器の外側に設けられる電磁石でもよく、電磁石は生じさせる磁場の変化に応じて、磁性を有する微粒子の電磁石への補足および電磁石からの解離を制御するものでもよい。

#### 【0009】

容器については内部に分岐する流路を有してもよく、磁性を有する微粒子及び／又は非磁性微粒子は、一の流路に収納され、任意の磁性を有する微粒子及び／又は非磁性微粒子は、他の流路の開口端よりを取り出されてもよい。

#### 【0010】

さらに、容器の開口端より取り出された磁性を有する微粒子及び／又は非磁性微粒子により収集する、試料中の特定分子を流液などのよって移送する移送機構と、移送機構につながる電気泳動装置もしくは質量分析装置とをさらに有してもよい。

#### 【0011】

本発明に係わる微粒子アレーキットは、磁性を有する微粒子及び／又は非磁性微粒子を収納する容器と、容器の外側に配置される磁石部材と、特定分子と結合するものであり、かつ容器の内部のいずれかの位置に固定されるプローブとを有し、磁性を有する微粒子及び／又は非磁性微粒子は容器内で任意の配列で収納されていることを特徴とする。また、容器はキャピラリーもしくは基板に設けられた溝であってもよい。

#### 【0012】

本発明に係わる化学分析方法は、特定分子と特異的に結合するプローブと、任意の配列で並ぶ磁性を有する微粒子及び／又は非磁性微粒子とが収められた容器を設置する工程と、特定分子を含む試料と溶液とを容器に導入する工程と、容器の外部に設置する磁石部材を用いて磁性を有する微粒子の位置を制御する工程と、特定分子とプローブとの結合の結果を検出する工程を有することを特徴とする。また、磁性を有する微粒子及び／又は非磁性微粒子を回収する工程をさらに有

してもよく、その場合には、磁石部材を容器に対して相対的に動かすことにより、磁性を有する微粒子を容器に対して相対的に動かし、磁性を有する微粒子または非磁性微粒子は、磁性を有する微粒子の動きにより、容器の開口端より取りだされ、回収されてもよい。または、この場合に、磁石部材として電磁石を用い、電磁石の磁場を制御することにより、電磁石による任意の磁性を有する微粒子の補足および解離を制御し、任意の磁性を有する微粒子は、電磁石による補足の後解離されて、容器の内部に生じる溶液の流れで輸送され、かつ容器の開口端より取り出され、回収されてもよい。

### 【0013】

#### 【発明の実施の形態】

以下、本発明の実施例を図を参照して詳細に説明する。

図1は、本発明の第1の実施例の微粒子アレー分析システムとその分析の過程を模式的に示すものである。図1(A)は微粒子アレーと磁石の組み合わせの一例である。この実施例では微粒子アレーはキャピラリー103の中に一列に構成されている。微粒子の並びの両端には磁気微粒子101を配し、その内部にはプローブ付きガラスビーズ102を配している。それぞれのガラスビーズ102は違う種類のDNAプローブが固定されており、任意の配列で並べられている。また、このビーズの配列順序によりプローブの種類を判別できるようになっている。このガラスビーズへのプローブDNAの固定には様々な方法が利用できるが、ここではガラスビーズにシランカップリング剤の一つである3-アミノプロピルトリメトキシシランでアミノ基を導入し、このアミノ基導入ビーズにN-(11-マレイミドウンデカノキシロキシ)スクシイミドでマレイミド基を導入したあとに5'末端チオール修飾のオリゴDNAプローブを固定する方法（例えば、非特許文献6）を利用した。磁気微粒子101とガラスビーズ102の径は100ミクロンであり、キャピラリー103の内径は150ミクロンである。磁気微粒子101とプローブ付きガラスビーズ102の径がキャピラリー103の内径の半分よりも大きいため、磁気微粒子101とプローブ付きガラスビーズ102、もしくはガラスビーズ102同士の間で順序が入れ替わることはない。この微粒子アレーの作製には、既に報告されている作製方法を使用することができる（例えば、特許文献2、特許文献3、特許文献4）。キャピラリ

ーの外側には磁石104、104' を配置して磁気微粒子アレー内部の磁気微粒子101を固定する。磁気微粒子101を強固に固定するためには磁力の強い磁石が有効であり、例えば希土類ネオジム磁石を使用すればよい。微粒子アレー両端にある磁気微粒子101がキャピラリー103に対して固定されているため、磁気微粒子101の間に挟まれているプローブ付きガラスビーズ102がキャピラリー103の外部へ出て行くことはない。従来ステンレスワイヤー等の障害物を微粒子アレーの両側においてキャピラリーの内部にとどめる方式を採っていたが、磁気微粒子と磁石を使う上記の構成を用いることにより、簡便にビーズをキャピラリーの内部にとどめることができる。

#### 【 0 0 1 4 】

図1(B)は図1(A)で示した微粒子アレーと磁石の組み合わせに対して反応を行わせる作業を行う実施例の構成を表す模式図である。反応を行う際には、微粒子アレーの一端にコネクタ105とチューブ106を介してシリンジポンプ108にセットしたシリンジ107を接続する。また微粒子アレーのもう片端にコネクタ105とチューブ106、三方弁109を介したサンプル容器110と洗浄溶液容器111を接続する。微粒子アレーは反応の間中、適切な反応温度に調整された恒温槽中に設置される。サンプル溶液中のターゲットDNAを検出する場合、プローブ付きガラスビーズ102上のプローブDNAとハイブリダイゼーション反応を利用してビーズ上に捕捉することになるが、この温度は通常55℃前後に設定されることが多い。ターゲットDNAは予め蛍光標識されており、サンプル容器110に入っている。まず初めに三方弁109を操作しサンプル容器110とチューブ106がつながるように設定した後、シリンジポンプ108にてシリンジ107を引き、磁気微粒子アレー中にサンプル溶液を引き込み、続けてシリンジポンプ108を利用しサンプル溶液を往復させ、プローブ付きガラスビーズ102上のプローブDNAとの反応を促進させる。例えば10分間反応させた後、三方弁109を洗浄溶液容器111とチューブ106がつながるように設定した後、シリンジ107にてサンプル溶液を磁気微粒子アレーから排出し、かつ洗浄溶液を引き込み、微粒子アレー内部に残る余分なサンプル溶液を洗浄する。このとき、プローブ付きガラスビーズ102上に捕捉されたターゲットDNAのほとんどは洗浄後も残っており、次にこのターゲット分子を蛍光計測で観察する。

## 【0015】

図1(C)は図1(B)で示した微粒子アレーと磁石の組み合わせでの反応を行った後に蛍光計測を行う実施例の構成を表す模式図である。微粒子アレーと磁石104と104'の相対的な位置は固定されており、そのため磁気微粒子アレー内部の磁気微粒子101とプローブ付きガラスビーズ102の位置関係は反応を行う前と変化がない。この磁気微粒子アレーに使用するキャピラリー103の微粒子が配列される部分のポリイミドコーティングは蛍光計測の際に背景蛍光を発するので予め取り除いておく。蛍光計測のための励起光としてレーザ112を用いて、微粒子アレーをスキャンしビーズごとの蛍光強度を計測する。まず、レーザ112をダイクロイックミラー113で反射し、磁気微粒子アレーの各プローブ付きガラスビーズ102を照射する。その結果、ビーズ上に捕捉されたターゲットDNAを標識している蛍光体が励起され、固有の蛍光を発する。ビーズ表面で発生した蛍光をレンズ114を介して集光し、その蛍光に対応する光学フィルタ115を通過させた後、光電子増倍管116の受光面へ集光する。この光電子増倍管116からの信号をパーソナルコンピュータ117上で解析することで、各ビーズ由来の蛍光量を得ることができる。この蛍光量はサンプル中に存在した、ビーズ上のプローブに対応する、ターゲットDNAの量と相関していると考えられる。

## 【0016】

図1(D)は図1(C)で示した磁気微粒子アレーと磁石の組み合わせで狙いのビーズを取り出し、そのビーズ上に捕捉されたターゲットDNAを回収した実施例の構成を示す模式図である。図には示していないが、磁石は磁石の位置を制御している磁石移動機構により、2次元もしくは3次元の方向に移動させることができる。図1(C)での計測結果から選ばれた特定のビーズを回収している。たとえば計測の結果、右から二番目のプローブ付きビーズを回収する必要がある場合には、まず磁石104'を取り外し、磁石104を磁気微粒子アレーに沿って右側に動かす。そうすると、キャピラリー103の開口部118から磁気微粒子につづいてプローブ付きビーズを順番に押し出すことが出来る。右から1番目のビーズを押し出して廃棄ビーズ用容器に回収した後さらに押し出すと、開口部から2番目のビーズ119が出てくるので、これを回収容器120に回収する。回収の際には、磁気微粒子アレーを

顕微鏡で観察しながら磁石104の操作を行う方法と、予め磁石104を動かす距離を算出しておいてその距離を動かす方法の二つがある。回収したビーズ119の表面にはプローブによって捕捉されたターゲットDNAが存在しており、回収容器120をヒートブロック121に載せ、94℃で5分程度加熱し、熱変性させることで溶液中に容易に回収することが出来る。ここではヒートブロックによる熱変性でターゲットDNAを変性させて回収する実施例を示したが、回収したビーズを溶液中でレーザー照射し加熱する方法や0.1 M程度の水酸化ナトリウム溶液を用いてアルカリ変性させる方法をとる事もできる。

#### 【0017】

この実施例では磁気微粒子は微粒子アレーの両端に一つずつ入っているだけであるが、両端部に相当する磁気微粒子の数は複数でもよく、また端部以外に部位に入っていてもよい。また、ガラスビーズの代わりにプローブ付きの磁気微粒子を使用してもよい。また、アレー内の全ての微粒子が、プローブ付きの磁気微粒子であってもよい。

図2は、本発明の第2の実施例の微粒子アレーと磁石の関係の概略を模式的に示すものである。図2(A)は微粒子アレーと磁石を上から見た模式図、図2(B)は磁気微粒子アレーと磁石を横から見た模式図である。この磁気微粒子アレーは第1の実施例のものとは異なり、チップの内部に構成されており、内部の溝206に配列された微粒子アレーが外部の磁石203によって操作される。このチップはPDMS（ポリジメチルシロキサン）を材料として作製した樹脂部分201とスライドガラス202を張り合わせた構造になっている。チップのPDMS部分201のスライドガラスに接する側には、十字の溝206～209が形成されており、そのうちの一つの溝206に磁気微粒子アレーが構成される。このPDMS樹脂部分201に溝206～209を作製するためには、例えば半導体の製造工程でよく使用されるフォトリソグラフィの技術を用いる方法（例えば、非特許文献7）で作製された鋳型を使用する。この鋳型は、フォトレジストの一つであるSU-8をスピンコートしたSi基板上に溝の形状を反映したマスクを通じた光を照射して作製する。この鋳型上に液状のPDMSと固化化触媒の混合物を流し込み、200℃で1時間程度加熱し、鋳型から外すことで、チップのPDMS部分201が得られる。各溝の先端はパンチで貫通穴を開けておき

、コネクタを介して外部配管と接続する配管口210～213を作っておく。このPDMS部分201の接合面を酸素プラズマで照射した後にスライドガラス202に貼り付ける。この実施例では磁気微粒子204とプローブ付きガラスビーズ205は交互に任意の配列で配列されており、プローブ付きビーズ205同士の順列は予めそのビーズ上のプローブ種によって決められている。この磁気微粒子アレーも第1の実施例のものと同様の作製方法で作成することができる。すべての溝206～209の形状は130ミクロン角であり、磁気微粒子204とプローブ付きガラスビーズ205の径は100ミクロンであるため、磁気微粒子204およびプローブ付きガラスビーズ205の間で順序が入れ替わることは無い。第1の実施例同様、プローブとしてはDNAプローブを用いて、サンプル溶液中の蛍光標識ターゲットDNAを特異的に捕捉し回収するために、この微粒子アレーを使用した。溝206中に配列された磁気微粒子204とプローブ付きガラスビーズ205は、磁石203を溝206に沿って動かすことで操作できる。このチップと磁石203は反応及び洗浄の間、反応温度を一定に保つために、温度調整された温調プレートの上に保持される。このチップの大きさは25 mm×75 mmであり、JIS規格のスライドガラスと同じ大きさである。スライドガラスの厚みが1 mm、PDMS部分の厚みが2 mm、あわせて3 mm と薄いため、既存のDNAチップスキャナーを用いた蛍光計測が可能であり、この実施例ではその方法を採用した。

図3は、本発明の第2の実施例の微粒子アレーに対して反応後にビーズを取り出す工程を模式的に示すものである。すべてチップの上側から観察した模式図であり、磁石203はスライドガラス202を介して位置している。図3(A)は反応および洗浄過程における磁気微粒子アレーチップと磁石203の位置関係を示す模式図である。チップの下側にある磁石203によって磁気微粒子204とプローブ付きガラスビーズ205は固定されている。チップの配管口のうち配管口210と211を利用してサンプル溶液の流通とサンプルとの反応後の洗浄を行う。第1の実施例を表す図1と同様に、配管口211にコネクタとチューブを介してシリンジポンプに接続したシリンジを接続する。また、配管口210にコネクタとチューブ、三方弁を介したサンプル容器と洗浄溶液容器を接続する。これら接続操作の後、第1の実施例で述べた手順でサンプルの反応と洗浄を行う。図3(B)および(C)は磁石203の

移動により磁気微粒子204とプローブ付きガラスビーズ205を移動させる模式図である。回収の対象となるプローブ付きビーズ214を4本の溝206～209が十字に交差する点に移動させる。この図では磁石203を移動しているが磁石の位置を固定しチップを動かすことによっても同じ効果が得られる。図3(D)は回収の対象となるプローブ付きガラスビーズ214を溝209を通じて回収する模式図である。ここでは溶液の流れの力によって対象となるガラスビーズを移動させている。配管口212にポンプを接続し、磁気微粒子204とプローブ付きガラスビーズ205が配列している溝206及び207と交差する溝208と209に溶液を流す。ここでは溶液として純水を使用した。溶液の流れにより、摩擦力で止まっていた回収の対象となるガラスビーズ214が動き出し、配管口213から回収できる。

#### 【 0 0 1 8 】

図4は、本発明の第3の実施例の磁気微粒子アレーと磁気微粒子アレーの操作方法の概略を模式的に示すものである。この実施例では複数種類のプローブ付き磁気微粒子を意図した順序で並べた磁気微粒子アレーを作製し、サンプル中のターゲットを各プローブ付き磁気微粒子に捕捉し、それぞれ個別に回収している。キャピラリー401の外部にプローブの種類分の数の電磁石405-407が設置してあり、これらの電磁石405-407とキャピラリー401内の溶液の流れで磁気微粒子を操作する。まず第1のプローブを固定した磁気微粒子402をキャピラリー401の中に流し入れる。その際に流し込む入り口から最も遠い位置にある電磁石405をオンにし、残りの電磁石406-407をオフにすることで、一番端の電磁石401の位置に磁気微粒子402が固定される。次に第2のプローブを固定した磁気微粒子403を流し入れる際に、端から2番目の電磁石405をオンに変える事でその位置に磁気微粒子403を固定することができる。この工程を順次繰り返すことで、違うプローブを固定した磁気微粒子を特定の順序でキャピラリー401に固定し、任意の配列を有する磁気微粒子アレーを構成することができる。磁気微粒子アレーを構成した後はすべての電磁石405-407をオンに保っておく。この磁気微粒子アレーに対してサンプル溶液を流通させて反応を行い、ターゲット分子を各プローブ付き磁気微粒子に捕捉した後、洗浄する。この反応及び洗浄は第1の実施例と同じ方法で行う。この実施例ではターゲットの蛍光計測は行わず、直ちに各磁気微粒子を個別に



回収する。まず、キャピラリー401内部に溶液を流し、流れの一番下流側の電磁石405をオフにすることで、第1のプローブ付き磁気微粒子402をターゲット分子ごと回収する。次に、流れの下流側から2番目の電磁石406をオフにすることで、第2のプローブ付き磁気微粒子403をターゲット分子ごと回収する。以降も同様な手順を踏み、最も流れの下流側にあるオンの状態にある電磁石をオフにする操作を繰り返すことで、それぞれ特異なターゲット分子408-410を捕捉している磁気微粒子402-404を個別に取り出すことができる。

#### 【0019】

この実施例では磁気微粒子にプローブを固定した例を示したが、同じことはプローブなしの磁気微粒子とプローブ付きガラスビーズを組み合わせることによっても可能である。まず磁気微粒子を電磁石で流路内に固定し続いてガラスビーズを流し込む手順により、固定された磁気微粒子によってガラスビーズを任意の位置にせき止めることができる。また回収の際には、上記の場合と同様に電磁石をオフにすれば、特異なターゲット分子を捕捉しているガラスビーズを個別に取り出すことができる。

#### 【0020】

図5(A)は、本発明の一実施例に基づく磁気微粒子アレーを組み込んだ電気泳動による核酸解析システムの構成図である。図中、点線で囲った部分が本発明の一実施例に基づく磁気微粒子アレーとその操作を組み込んだ部分である。ここでは、多項目のmRNAの発現頻度分布計測を磁気微粒子アレーで行い、蛍光検出結果に基づいてプローブ付き微粒子を微粒子アレー内部から回収し、回収したプローブ付き微粒子に捕捉されているターゲットDNAを熱によりプローブから剥がし、電気泳動装置で長さを解析するシステムを想定している。まず調べたい対象組織、ここでは1mLのヒトの全血、からmRNAを抽出し、逆転写酵素と蛍光標識dNTPを用いて蛍光検出可能なcDNA群を合成する。このように調製されたサンプルを磁気微粒子アレーに導入し、蛍光観察することによって多項目の発現頻度解析を行うことができる。ここでは第2の実施例のようにPDMS-スライドガラス製のチップ中に構成された微粒子アレーを使った。発現頻度解析の結果、興味深い蛍光強度の挙動を示すプローブ付き微粒子が見つかった場合には、その微粒子を前述の方

法で回収することができる。ここではp53遺伝子のスプライシングバリエーションに注目したため、p53の各エクソンに相補な配列を持つプローブをガラスビーズに固定して磁気微粒子アレーを作製した。回収した微粒子上に捕捉されているcDNAは、熱変性もしくはアルカリ変性にて微粒子から剥がすことができる。総量50 mLの剥がしたcDNA溶液の内10 mLを1 mLの10x電気泳動用のローディングバッファーに加え、キャピラリー電気泳動装置で最終的に長さ解析する。30cmのキャピラリーの内部には4%のポリリニアアクリルアミドを充填して使用した。サンプルのローディングは0.75kVの電圧を10秒間印加して行い、電気泳動は1.5kVの電圧を印加した。p53のエクソン8に相補なプローブを固定した微粒子から回収したcDNAを電気泳動すると、図5(B)のように3本のバンドが観測された。微粒子アレーから微粒子を個別に回収することによって、プローブ間でのコンタミネーションの少ない個別回収が実現できている。

#### 【0021】

図6は、本発明の一実施例に基づく磁気微粒子アレーを組み込んだ質量分析装置によるタンパク質解析システムの構成図である。図中、点線で囲った部分が本発明の一実施例に基づく磁気微粒子アレーとその操作を組み込んだ部分である。ここでは多項目のタンパク質を、配列の異なる二本鎖DNAをプローブとして固定した磁気微粒子アレーに捕捉し、捕捉後の微粒子を一つ一つ回収し、回収した微粒子に捕捉されているタンパク質群を変性させて剥がし、質量分析装置にかけて分子量を解析するシステムを想定している。この実施例では各プローブ配列に対応するDNA結合能を持つDNA結合性タンパク質を捕捉し、その分子量情報を得ることを目的として解析を行った。まずDNA結合タンパク質を調べたい組織もしくは生物種、ここでは100 mLの培養された酵母からタンパク質群を抽出する。このタンパク質群を1 mg/mL程度濃度になるようにpH7-トリス緩衝溶液に溶かし、このように調製されたサンプルを磁気微粒子アレーに導入し、微粒子アレー内を往復させ、各微粒子上のプローブへの捕捉反応を促進させる。ここでは第1の実施例のようにキャピラリー中に構成された微粒子アレーを使った。各微粒子は前述の方法で順に回収することができる。回収した微粒子上に捕捉されているDNA結合性のタンパク質を純水10 mL中、94℃30分間熱変性することで微粒子か

ら剥がすことができる。総量10 mLの剥がしたタンパク質溶液の内 1 mLをマトリックスと混合し、マトリックス支援レーザーイオン化飛行時間形質量分析計にかけて分子量分布を測定できた。この実施例では二本鎖DNAをプローブとして固定しているが、生体関連低分子やタンパク質をプローブとして固定したシステムも同様に可能である。

#### 【0 0 2 2】

【非特許文献 6】 Nucleic Acids Research, 30, e87 (2002)

【非特許文献 7】 Electrophoresis, 22, 328-333(2001)

【特許文献 2】 特開平11-243997号公報

【特許文献 3】 特開2000-346842号公報

【特許文献 4】 特開2002-117487号公報

#### 【発明の効果】

磁気微粒子アレーの磁気微粒子の位置を制御することにより、微粒子に固定されたプローブを識別しつつプローブに捕捉された生体関連分子を解析して多項目解析を行うことができ、かつプローブ種別に回収することができる。

#### 【0 0 2 3】

また、プローブに捕捉された生体関連分子を解析し、かつプローブ種別に回収し、別種の解析を行う手段を提供すること、ができる。

#### 【0 0 2 4】

さらに、低コストで実用的な生体関連分子の捕捉および解析を行うシステムを提供することができる。

#### 【図面の簡単な説明】

##### 【図 1】

本発明の一実施例に基づく微粒子アレー分析システムとその分析の過程の模式図。

##### 【図 2】

本発明の一実施例に基づく磁気微粒子アレーと磁石の模式図。

##### 【図 3】

本発明の一実施例に基づく磁気微粒子アレーと磁石の操作工程の模式図。

## 【図 4】

本発明の一実施例に基づく磁気微粒子アレーとその使用方法の模式図。

## 【図 5】

電気泳動を用いた核酸の解析プロトコル、及び、本発明の一実施例に基づく磁気微粒子アレーを組み込んだ核酸解析システムの構成図。

## 【図 6】

質量分析装置を用いたタンパク質の解析プロトコル、及び、本発明の一実施例に基づく磁気微粒子アレーを組み込んだタンパク質解析システムの構成図。

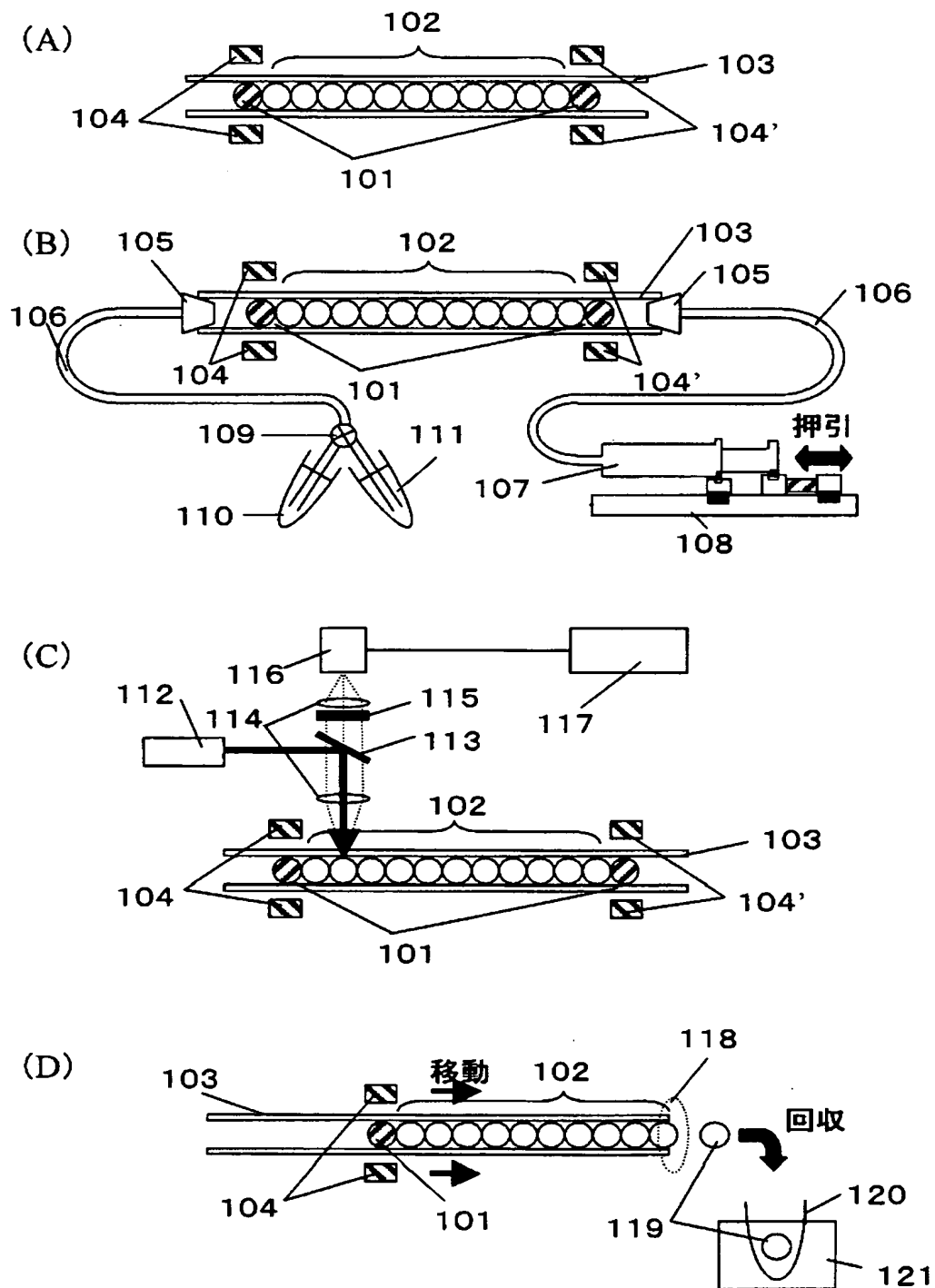
## 【符号の説明】

101：磁気微粒子、102：プローブ付きガラスビーズ、103：キャピラリー、104：磁石、104'：磁石、105：コネクタ、106：チューブ、107：シリンジ、108：シリンジポンプ、109：三方弁、110：サンプル容器、111：洗浄溶液容器、112：レーザ、113：ダイクロイックミラー、114：レンズ、115：光学フィルタ、116：光電子増倍管、117：パーソナルコンピュータ、118：キャピラリー103の開口部、119：2番目のプローブ付きビーズ、120：回収容器、121：ヒートブロック、201：チップの樹脂部分、202：スライドガラス、203：磁石、204：磁気微粒子、205：プローブ付きガラスビーズ、206～209：チップ内部の溝、210～213：チップの配管口、214：回収対象のプローブ付きビーズ、401：キャピラリー、402：第1のプローブを付けた磁気ビーズ、403：第2のプローブを付けた磁気ビーズ、404：第3のプローブを付けた磁気ビーズ、405：第1の電磁石、406：第2の電磁石、407：第3の電磁石、408：第1のプローブで捕捉されるターゲット分子、409：第2のプローブで捕捉されるターゲット分子、410：第3のプローブで捕捉されるターゲット分子。

【書類名】 図面

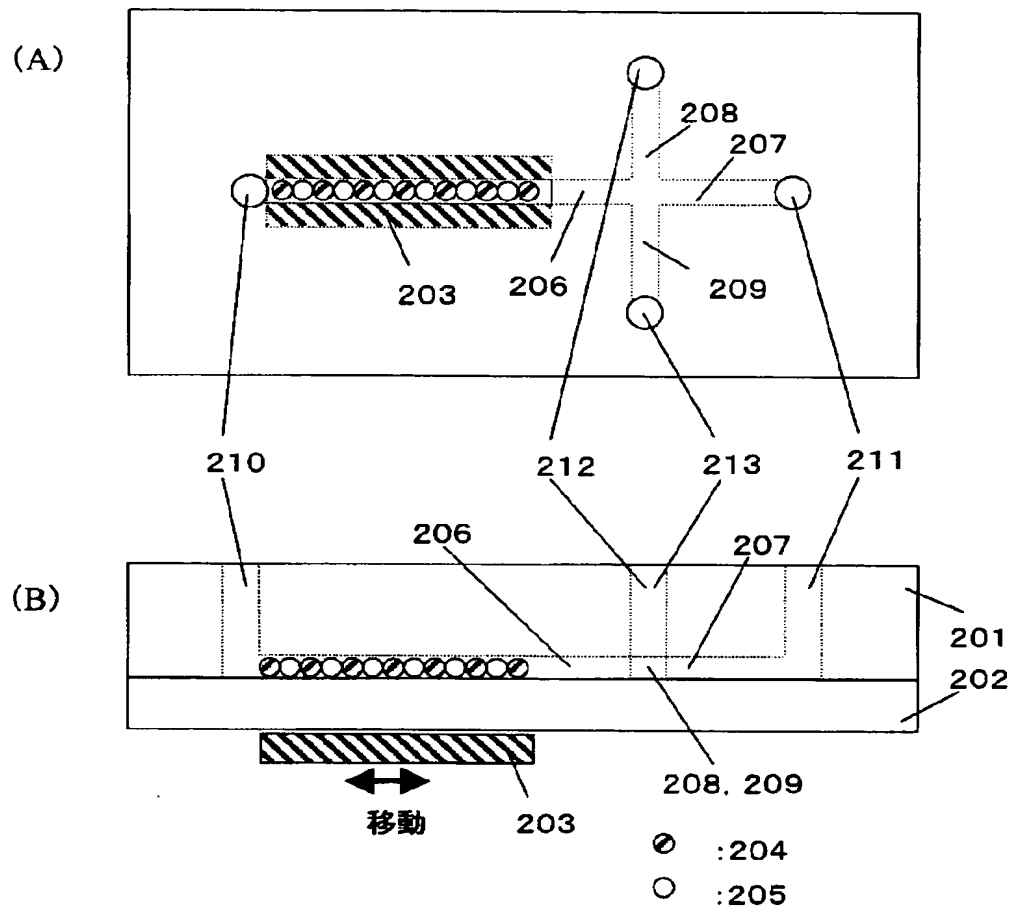
【図 1】

図 1



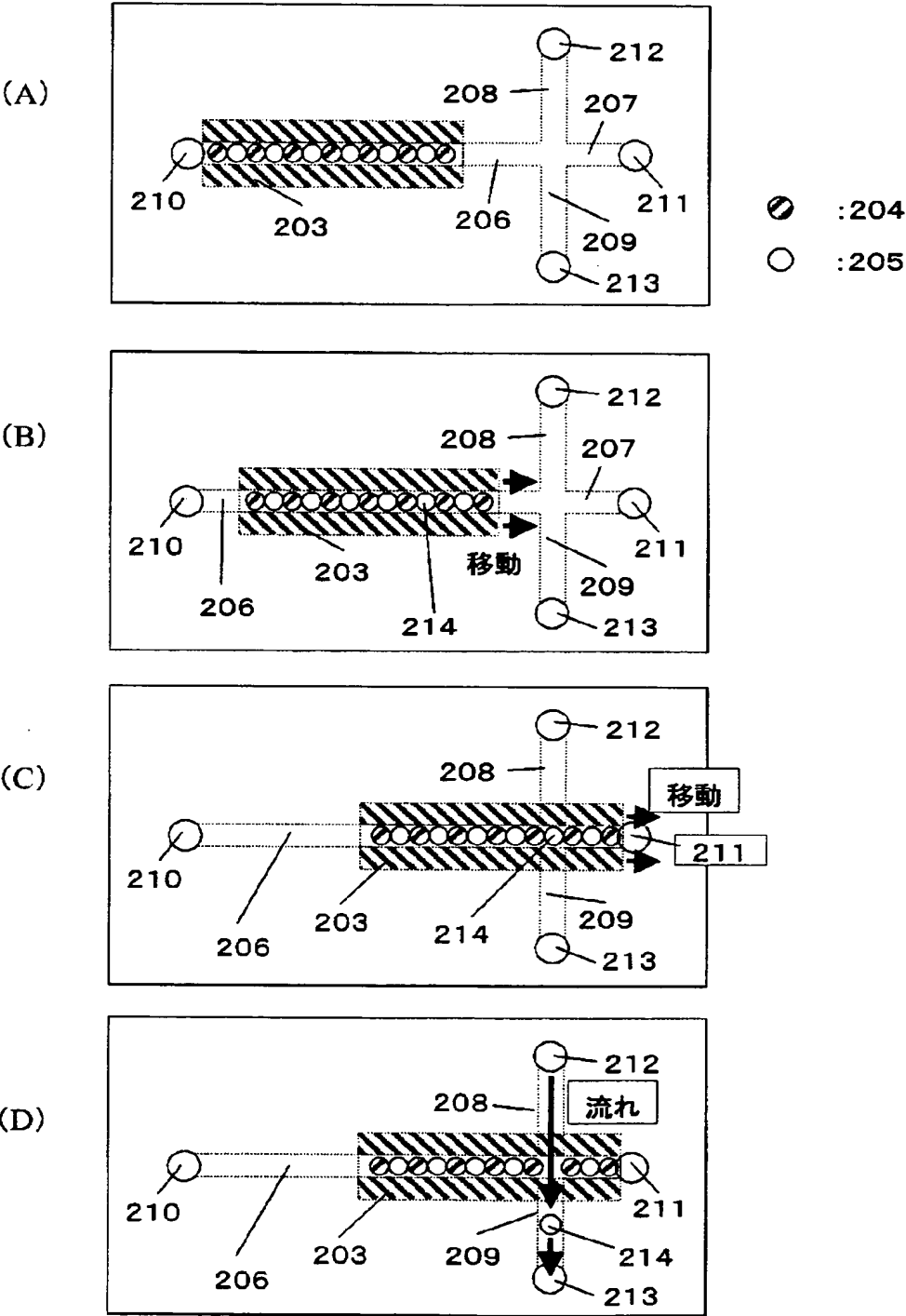
【図 2】

図2



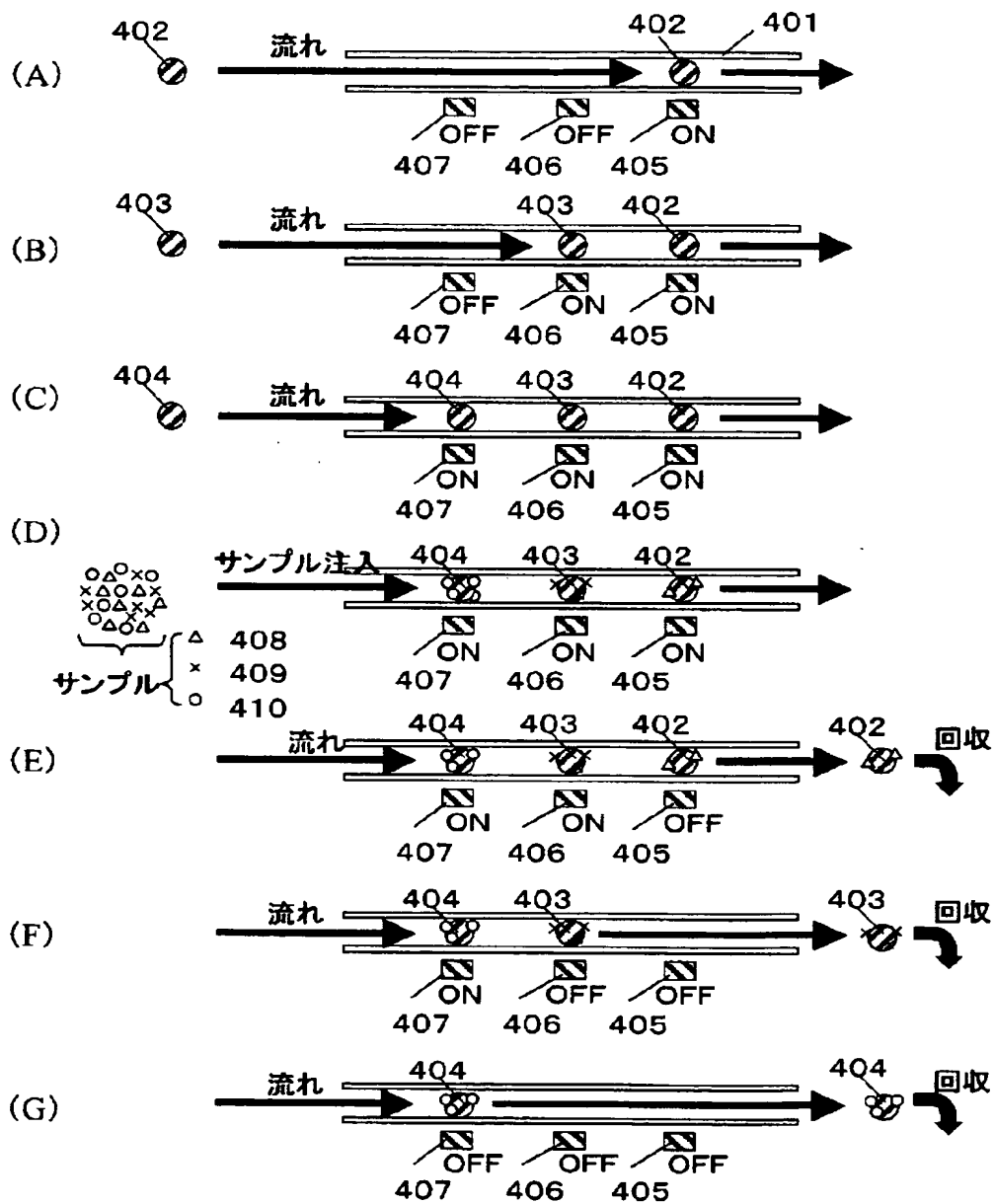
【図 3】

図3



【図 4】

図4

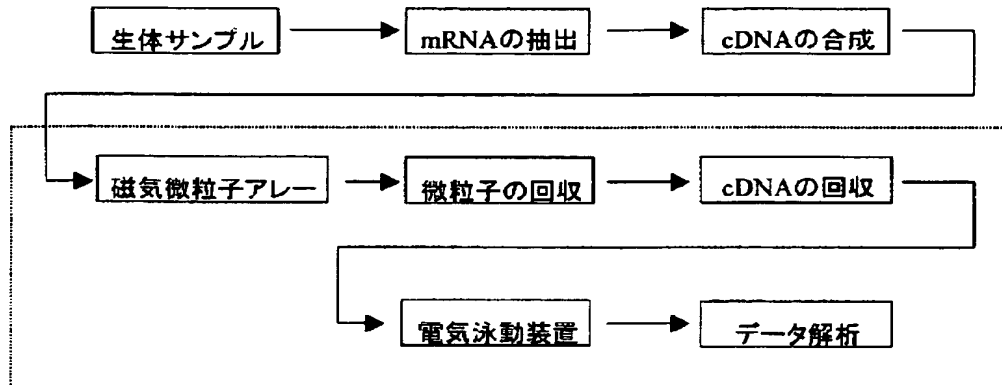




【図 5】

図5

(A)

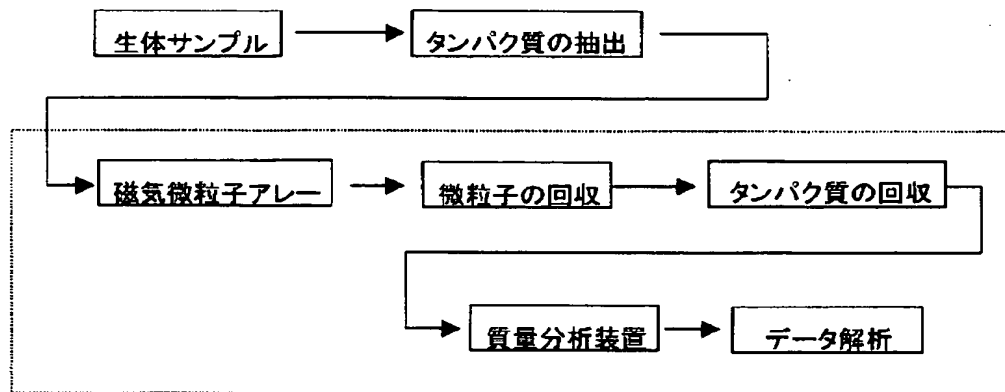


(B)



【図 6】

図6



【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 多項目解析に対応するプローブ種別に捕捉された生体関連分子を解析し、かつプローブ種別に回収する手段を提供する。

【解決手段】 キャピラリー中の磁気微粒子とそれぞれ違う種類のDNAプローブが固定してあるプローブ付きガラスビーズの並びで構成される磁気微粒子アレーは、磁石によって固定されている。シリンジポンプと三方弁を操作し磁気微粒子アレー中にサンプル溶液を往復させ、プローブ付きガラスビーズ上のプローブDNAと反応させた後、洗浄溶液を引き込み、内部を洗浄する。次にビーズごとの蛍光強度を測定する。さらに、蛍光計測の結果から特定のビーズを回収する。回収したビーズの表面に捕捉されたターゲット分子を加熱変性により剥がして次の解析を行うことができる。

【選択図】 なし

認定・付加情報

特許出願の番号	特願 2 0 0 3 - 1 3 2 4 6 4
受付番号	5 0 3 0 0 7 7 4 5 5 4
書類名	特許願
担当官	第五担当上席 0 0 9 4
作成日	平成 1 5 年 5 月 1 3 日

< 認定情報・付加情報 >

【提出日】	平成15年 5月12日
-------	-------------

次頁無

特願 2 0 0 3 - 1 3 2 4 6 4

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号

[ 0 0 0 0 0 5 1 0 8 ]

1. 変更年月日

1 9 9 0 年 8 月 3 1 日

[変更理由]

新規登録

住 所

東京都千代田区神田駿河台 4 丁目 6 番地

氏 名

株式会社日立製作所